

PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12M 1/34, 1/40</p>	<p>A2</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/60094</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 25. November 1999 (25.11.99)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/01443</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 12. Mai 1999 (12.05.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 22 827.9 20. Mai 1998 (20.05.98) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; Leo-Brandt-Strasse, D-52425 Jülich (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): NOLL, Thomas [DE/DE]; Kopernikusstrasse 16, D-52428 Jülich (DE). MÜHLENSIEPEN, Heinz [DE/DE]; In den Domänen 11, D-52382 Niederzier (DE). CREMER, Markus [DE/DE]; Artilleriestrasse 64, D-52428 Jülich (DE). PAPASPYROU, Manfred [DE/DE]; Pater-Pauels-Weg 8, D-52428 Jülich (DE). LANGEN, Karl-Josef [DE/DE]; Nachtigallenweg 13, D-52511 Geilenkirchen (DE). ENGELS, Ralf [DE/DE]; Dürener Strasse 29, D-52393 Hürtgenwald (DE). REINARTZ, Richard [DE/DE]; Dechant-Kallen-Strasse 38, D-52379 Langerwehe (DE). HAMACHER, Kurt [DE/DE]; Breiniger Strasse 8, D-52076 Aachen (DE). BISELLI, Manfred [DE/DE]; Max-Hermkes-Platz 8,</p>	<p>D-52428 Düren (DE). HOLSCHBACH, Markus [DE/DE]; Schleckheimer Strasse 85, D-52076 Aachen (DE).</p> <p>(74) Anwalt: PROP, Gerrit; Anemonenweg 23, D-50259 Pulheim (DE).</p> <p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</p>	

(54) Title: METHOD FOR CARRYING OUT A MEASUREMENT OF THE INTERACTION OF CHEMICALS WITH CELLS

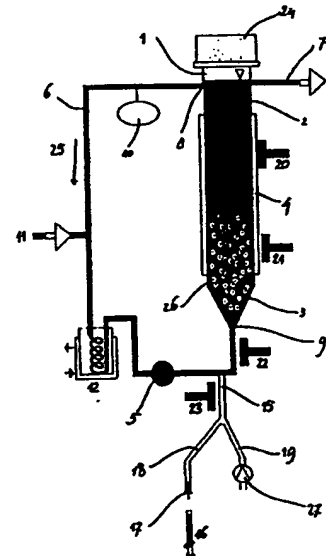
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR DURCHFÜHRUNG EINER MESSUNG DER INTERAKTION VON CHEMIKALIEN MIT ZELLEN

(57) Abstract

The invention relates to a method for determining the interaction of chemicals with cells in a reactor, e.g. in a fixed-bed reactor or in a fluid-bed reactor. To this end, a signal is measured which is produced by one of the components affected during the reaction. The signal is suited for being detected by a detection system situated outside of the reactor. The component which produces the signal can be the chemical itself in which case it can concern the analysis of the pharmacokinetic characteristics of the chemical. An additional possibility relates to the analysis of an influence of the chemical on processes within the cell. A device for carrying out the inventive method comprises a reactor for accommodating the cells, a circulation system, control units for monitoring the composition of the medium, a system for gassing the medium, an entry for the chemical and at least one detection system for detecting the interaction.

(57) Zusammenfassung

Verfahren zur Bestimmung der Interaktion von Chemikalien mit Zellen in einem Reaktor, z.B. einem Festbettreaktor oder einem Wirbelschichtreaktor. Dabei wird ein Signal gemessen, welches von einer der bei der Interaktion betroffenen Komponenten produziert wird. Das Signal ist dazu geeignet von einem Detektionssystem ausserhalb des Reaktors erfasst zu werden. Die Komponente, welche das Signal produziert, kann die Chemikalie selbst sein, in welchem Fall es sich um die Untersuchung der pharmakokinetischen Eigenschaften der Chemikalie handeln kann. Eine weitere Möglichkeit betrifft die Untersuchung eines Einflusses der Chemikalie auf Vorgänge innerhalb der Zelle. Eine Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens umfasst einen Reaktor zur Aufnahme von Zellen, ein Umlaufsystem, Kontrollorgane zur Überwachung der Zusammensetzung des Mediums, eine Anordnung zur Begasung des Mediums, einen Eingang für die Chemikalie und mindestens ein Detektionssystem zur Erfassung der Interaktion.



BEST AVAILABLE COPY

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren zur Durchführung einer Messung der Interaktion von Chemikalien mit Zellen.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Durchführung einer Messung der Interaktion von Chemikalien mit Zellen wobei die Zellen in einem Reaktor enthalten sind. Die Erfindung
5 betrifft auch eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens sowie dessen Verwendung.

Interaktionen von Chemikalien mit Zellen werden in der biologischen Forschung häufig gemessen. Das Augenmerk solcher Untersuchungen kann unterschiedlich sein. Einerseits
10 werden solche Untersuchungen vorgenommen, um festzustellen, ob Chemikalien eine bestimmte Wirkung auf die Zellen ausüben. Es kann sich dabei um eine pharmakologische Wirksamkeit handeln, wenn das Ziel der Untersuchungen das Auffinden neuer Wirkstoffe ist, es kann sich aber auch um die Feststellung einer toxischen Eigenschaft handeln. Beide Typen von Messungen werden im Rahmen eines Substanzscreenings anfallen, wo es immer auf einem
15 bestimmten Verhältnis der biologischen Wirksamkeit im Vergleich zur Toxizität ankommt.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit ist die Erfassung der pharmakokinetischen Eigenschaften einer Chemikalie. Auch die pharmakokinetischen Eigenschaften von Chemikalien müssen im Rahmen einer Produktentwicklung untersucht werden, wenn
20 beabsichtigt ist, das Produkt am Menschen oder bei Tieren anzuwenden. Im Rahmen der Untersuchung pharmakokinetischer Eigenschaften werden die Absorption der Chemikalie, seine Verteilung im Körper, sein Metabolismus und seine Ausscheidung erfaßt. Was sich im Zellsystem hervorragend untersuchen läßt, ist die Aufnahme der Chemikalie in bestimmte Zellen, ihre Verstoffwechselung in diese Zellen und ihre Ausscheidung durch diese Zellen.

25

Die biologische Aktivität von Chemikalien wird letztlich am Tier erfaßt. Ein großer Vorteil von Versuchen in Zellsystemen stellen jedoch ihre bessere Standardisierung, ihre Einfachheit und ihre geringeren Kosten dar. Versuche am Tier werden nicht nur erschwert durch gesetzliche Regelungen, sie sind immer teuer und aufwendig und die Widerstand in der Bevölkerung gegen
30 solche Versuche nimmt ständig mehr zu.

Aus diesem Grund ist es begrüßenswert und notwendig, die Möglichkeit zu haben, die Eigenschaften von Chemikalien in einem Prüfverfahren ohne Verbrauch von Tieren zu

screenen. Wenn auch solche Prüfverfahren die Tierversuche nie gänzlich ersetzen werden, ist ihr großer Vorteil bereits dadurch begründet, daß sie als Vorscreening in der ersten Phase der Entwicklung von Chemikalien die Durchführung vieler Tierversuche überflüssig machen werden.

5

Versuche zur Durchführung von Messungen bezüglich der Interaktion von Chemikalien mit Zellen sind im Stand der Technik bekannt.

So beschreibt die P 195 37 033.3 die Durchführung von Messungen an Zellen in einem Reaktor zu Erfassung von pharmakokinetischen und toxikokinetischen Eigenschaften. Als Reaktor wird ein Wirbelschichtreaktor verwendet welche blasenfrei begast wird. Die Zellen sind an Trägerkörpern angelagert. Mit diesem Verfahren ist es grundsätzlich möglich, eine Reihe von Fragestellungen aufzuklären. Das Verfahren zeigt sich durch gute Anwendbarkeit aus. Nachteilig bei dem bekannten Verfahren war jedoch die Tatsache, daß es gemäß diesem Verfahren vorgesehen war, eine off-line Erfassung der Daten vorzunehmen, d.h. es war erforderlich dem Reaktor regelmäßig Proben zu entnehmen, damit die Effekte der Chemikalie auf die Zellen erfaßt wurden.

Eine ständige Entnahme von Proben zur Erfassung von Daten ist in mancher Hinsicht problematisch. Eine Entnahme von Material aus dem Reaktor führt zu einer Veränderung im System, wenn eine häufige Entnahme erforderlich ist, kann diese Veränderung sogar erheblich sein. Außerdem führt diese Art von Erfassung zu einer gewissen Verzögerung im Verfahren. Wenn es erforderlich ist, anhand der erfaßten Meßwerte Veränderungen im System vorzunehmen, etwa durch eine Zugabe der Chemikalie, kann diese Veränderung frühestens nach Bestimmung des jeweiligen Meßwertes gemacht werden. Diese Trägheit ist grundsätzlich von Nachteil. Auch die Tatsache, daß überhaupt Messungen durchgeführt werden müssen, ist unerwünscht. Messungen binden Material und Personal und sind für die Etablierung von Verfahren im Routinescreening unerwünscht.

Es war die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, daß die Nachteile des Standes der Technik nicht besaß und durch eine einfachere Erfassung von Meßdaten besser in einem Screeningsystem einpaßbar ist.

Es war eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine Vorrichtung zur Verfügung zu stellen, mit welcher sich das erfindungsgemäße Verfahren durchführen läßt.

Die erstgenannte Aufgabe wird durch ein Verfahren mit den kennzeichnenden Merkmalen des
5 Hauptanspruchs gelöst.

Das Verfahren bezieht sich ganz allgemein auf die Interaktion von einer Chemikalie mit Zellen. Das Verfahren ist damit ausdrücklich nicht auf eine bestimmte Interaktion beschränkt.

10 Es ist somit im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens möglich, eine Wirkung der Zellen auf die Chemikalie zu erfassen. Das beinhaltet somit eine Aufnahme der Chemikalie in die Zellen, eine Umwandlung der Chemikalie in der Zelle und eine Ausscheidung der veränderten oder unveränderten Chemikalie durch die Zellen. Diese Wirkung der Zelle auf die Chemikalie betrifft Vorgänge, welche sich allgemein unter pharmakokinetischen Untersuchungen
15 subsumieren lassen.

Andererseits bietet das System die Möglichkeit, die Auswirkung der Chemikalie auf die Zellen des Prüfsystems zu untersuchen. Eine solche Interaktion wird häufig als Verschlechterung der Zustand der Zellen beobachtet. Eine direkte lethale Wirkung der Chemikalie auf die Zellen
20 wird üblicherweise als toxische Wirkung zu werten sein, es sei denn, die Zellen im Prüfsystem sind geradezu Targetzellen für einen gewünschten Angriff durch die Chemikalie wie etwa bei Tumorzellen, in welchem Fall die lethale oder toxische Wirkung erwünscht ist. Es sei jedoch daraufhin zu weisen, daß diese Art der Interaktion ebenfalls eine Beeinflussung biochemischer Vorgänge innerhalb der Zelle umfaßt, wobei die biochemischen Vorgänge Effekte auf dem
25 Niveau der Proteinsynthese, der DNA-Synthese oder der RNA-Synthese darstellen können.

Das Verfahren wird in einem Reaktor durchgeführt. Ein Reaktor ist die allgemeine Bezeichnung eines die Zellen umfassenden Gefäßes. Je nach Anordnung der Zellen im Reaktor wird dieser unterschiedlich bezeichnet. So kann das Verfahren sowohl mit einem
30 Wirbelschichtreaktor (auch Fließbettreaktor genannt) wie mit einem Festbettreaktor durchgeführt werden. Diese Möglichkeiten werden nachher im Rahmen der Beschreibung näher spezifiziert. Auch andere Anordnungen können durchaus in Betracht kommen.

Der Reaktor ist nicht auf ein bestimmtes Format beschränkt. Bevorzugt wird ein Reaktor mit einem Gesamtvolumen von etwa 50 ml, aber auch andere Abmessungen kommen in Betracht.

5 Ist der Reaktor ein Wirbelschichtreaktor, so ist das erfindungsgemäße Verfahren sehr gut mit dem in der P 195 37 033.3 beschriebenen Reaktor durchführbar. Ein solcher bevorzugter Reaktor weist ein Gesamtvolumen von etwa 50 ml auf. Der Reaktor ist am unteren Ende konisch verjüngt und der Durchmesser dieses Ende entspricht dem Durchmesser einer Leitung welche diesem Ende zugeordnet ist. Das Reaktorrohr besitzt einen Durchmesser von ca 10 - 20 mm bei einem Öffnungswinkel von ca. 25°.

10

Auch für die genaue Anordnung der Zellen im Reaktor gibt es mehrere Möglichkeiten. Die Zellen können als Zellkultur eingesetzt werden, wobei sie frei in einem geeigneten flüssigen Medium vorliegen. Die biologische Fachliteratur verschafft dem Fachmann ausreichend Information, wie er in bezug auf die Einrichtung einer Zellkultur vorzugehen hat.

15

Besonders bewährt hat sich jedoch eine Ausführungsform, bei welcher die Zellen nicht frei vorliegen, sondern sich an Trägerpartikeln angesiedelt haben und sie somit an diesen Trägerpartikeln als festen Partikeln immobilisiert sind. Diese Ausführungsform, welche z.B. in der P 195 37 033.3 beschrieben wird, führt zu überraschend hohen Zelldichten.

20 Wenn ein Reaktor mit einem Volumen von 50 ml verwendet wird, wird bevorzugt mit einer Trägermenge von 20 bis 25 ml Schüttvolumen gearbeitet. Auf dieser Menge Trägermaterial können 1 bis 5 g Zellen immobilisiert werden. Das Verfahren kann zu einer sehr hohen Zelldichte führen: pro ml Träger werden Zelldichten zwischen $5 \cdot 10^7$ und 10^8 Zellen erreicht. Die Dichte welche bei diesem Verfahren erreicht werden ist der natürlichen Situation
25 wesentlich näher wie die früheren in-vitro-Verfahren.

Das Verfahren ist nicht auf bestimmte Zellen beschränkt. Der Auswahl wird primär von der Einsetzbarkeit im Verfahren bedingt sein, weil nicht unbedingt alle Zelltypen für eine Anwendung in einer freien Zellkultur und ebenso nicht gemäß der bevorzugten
30 Ausführungsform für eine Ansiedlung an Trägermaterial geeignet sein.

Durchführbar ist das Verfahren sehr gut mit tierischen oder menschlichen Leber- oder Nierenzellen, eine Auswahl, welche speziell im Rahmen von pharmakokinetischen

Untersuchungen äußerst sinnvoll ist. Auch eine Anwendung mit Tumorzellen wird bevorzugt, speziell im Rahmen von Untersuchungen, welche sich auf ein Screening nach antikanzerogenen Verbindungen richten. Im allgemeinen kann behauptet werden, daß Zellen, mit welchen das erfindungsgemäße Verfahren nicht durchgeführt werden kann, z.Z. nicht bekannt sind.

5

Die festen Partikeln sind nicht an einer bestimmten Ausführungsform gebunden. Auch in bezug auf diese feste Partikeln gibt es eine beliebige Variation an Möglichkeiten. Einzige Bedingung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Voraussetzung, daß die festen Partikeln im ausgewählten flüssigen Medium nicht löslich sind. Ansonsten ist bei dem Material der Partikeln und bei deren genauen Geometrie lediglich auf deren Zweck im Verfahren zu achten. Im Rahmen der Erfindung wird es sicherlich eine bevorzugte Variante darstellen, von mehr oder weniger kugelförmige Partikeln auszugehen. Diese bieten eine relativ große Oberfläche, lassen sich hervorragend zu einer Packung stapeln und erlauben trotzdem einen ungestörten Durchfluß von flüssigem Medium.

15

Selbstverständlich betrifft die Möglichkeit, das Verfahren mittels eines Festbettes oder eines Wirbelschichtes auszuführen, gleichermaßen die freischwebenden Zellen wie die an festen Partikeln anhaftenden Zellen.

Wie nachher im Rahmen der Ausführungsbeispiele näher erörtert wird, ist es eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, es im Rahmen der Kultivierung von menschlichen Körperzellen zu verwenden. Bei solchen Versuchen haben sich bestimmte Partikeln als äußerst gut verwendbar gezeigt. Besonders zweckmäßig sind poröse Wirbelkörper mit 200 - 1500 µm Durchmesser und einer Dichte von mindestens 1,1 kg/l, deren Poren mit Medium gefüllt sind.

25

Zunächst wurden günstige Erfahrungen mit Siran®-Kugeln (Firma Schott, Mainz) gemacht. Solche Siran®-Kugeln sind poröse Glasträger mit etwa 50 % Porosität und einer Korngröße von 200 - 1500 µm, vorzugsweise von 400 - 700 µm. Die Glasträger können vor dem Einsatz im Verfahren mit einer verdünnten Gelatinelösung vorbehandelt werden. Die Siran®-Kugeln haben sich in Versuchen mit menschlichen oder tierischen Zellen immer wieder durch ihre hervorragenden Eigenschaften in bezug auf Haftung und Stabilität ausgezeichnet.

30

Eine weitere Variante welche ebenfalls bevorzugt im Rahmen von Untersuchungen mit Zellmaterial zur Anwendung kommt sind Kollagenmikroträger. Auch diese Träger sind in verschiedenen Größen und Ausführungen verfügbar. Kollagenmikroträger zeigen ähnlich gute Eigenschaften im Versuch, weisen im Vergleich zu den Glaskugeln eine besondere Eigenschaft auf, welche ihnen je nach Bedarf einen entscheidenden Vorteil verschaffen kann. Es kommt nämlich häufig bei der Anwendung von Partikeln mit angehafteten Komponenten vor, daß gewünscht wird, diese Komponenten am Ende der Reaktion zurückzugewinnen, mit dem Ziel eines erneuten Einsatzes oder einer anschließenden Weiterbearbeitung. Bei solchen Kultivierungen stellen die angewachsenen Zellen den Zweck des Versuches dar und ist es somit unumgänglich sie von den Partikeln, wie z.B. den Siran®-Kugeln oder den Kollagenmikroträgern zu lösen. Gerade dann zeigt sich der Vorteil der letztgenannten Partikeln, weil man die Kollagenmikroträger einfach in einem eine Kollagenase enthaltenden System überführen kann, mit der Folge, daß die Träger sich auflösen und die Zellen welche von dem Enzym nicht angegriffen werden aus der Lösung isoliert werden können.

15

Das erfindungsgemäße Verfahren wird in einem flüssigen Medium durchgeführt. Die Bedingungen im Reaktor, wie etwa die Zusammensetzung des Kulturmediums, die Temperatur, die Art der Begasung, usw. sind zu jedem Zelltyp einzeln zu bestimmen und zu optimieren. Die optimierten Reaktionsbedingungen sind bei dem erfindungsgemäßen Verfahren bevorzugt automatisch zu regulieren.

20

Es stellt ein besonderes Merkmal des erfindungsgemäßen Verfahrens dar, daß eine der bei der Interaktion zwischen der Chemikalie und den Zellen betroffenen Komponenten eine ein Signal produzierende Komponente darstellt. Eine solche Komponente wird bei der Interaktion zwischen der Chemikalie und den Zellen direkt oder indirekt beeinflusst.

25

Die Komponente kann somit die Chemikalie selber sein, so z.B. wenn es das Augenmerk der Untersuchung ist, festzustellen, ob die Chemikalie überhaupt von den Zellen beeinflusst wird. Es wird häufig die Information verlangt werden, ob die Chemikalie von der Zelle aufgenommen wird. Die Erkenntnis, daß eine bestimmte Chemikalie von bestimmten Zellen nicht aufgenommen wird, kann eine erhebliche Bedeutung haben. Auch die Erfassung eines zeitlichen Verlaufs der intrazellulären Konzentration einer Chemikalie kann bedeutende Aufschlüsse in bezug auf Wirksamkeit oder Nebenwirkungen von Chemikalien verschaffen.

30

Die Komponente kann aber genauso gut nicht die Chemikalie selbst sondern eine andere Komponente sein, wenn es z.B. das Augenmerk der Untersuchung ist, festzustellen, ob bestimmte intrazelluläre Abläufe in Anwesenheit der Chemikalie verändert werden. Es kann
5 hierbei z.B. untersucht werden, ob die Chemikalie eine Veränderung der Proteinsynthese ganz allgemein, oder der Synthese eines bestimmten Proteins oder der Synthese des Erbmateri- als oder der Teilung der Zelle bewirkt. Wenn es eine Untersuchung in bezug auf die Proteinsynthese betrifft, wird die betroffene Komponente möglicherweise eine bestimmte Aminosäure oder zwei Aminosäuren sein, wenn es jedoch eine Untersuchung in bezug auf eine
10 Veränderung der DNA- oder RNA-Synthese betrifft, wird möglicherweise eine der Bestandteile der DNA oder RNA als betroffene Komponente verwendet werden. Wenn wiederum ein anderer Vorgang untersucht wird, können noch andere Komponenten Gegenstand der Untersuchung sein. Es hängt somit von der Fragestellung bei der Untersuchung ab, welche Komponente im einzelnen Gegenstand der Untersuchungen wird.

15

Die betroffene Komponente welche Gegenstand der Untersuchung gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren ist, muß eine ein Signal produzierende Komponente sein. Durch dieses produzierte Signal ist der Untersucher in der Lage, zu erfassen, ob eine Interaktion zwischen Chemikalie und Zellen erfolgt und wie sich diese Interaktion auswirkt.

20

Das von der betroffenen Komponente produzierte Signal kann ein beliebiges Signal sein. Bedingung ist lediglich, daß ein solches Signal produziert wird und seine Erfassung durch ein Detektionssystem außerhalb des Reaktors erfolgen kann. Ein solches Signal kann z.B. radioaktive Strahlung sein, wenn bei der Durchführung des Verfahrens einen Radiotracer
25 verwendet wird. Eine weitere Möglichkeit betrifft Fluoreszenzstrahlung wenn bei der Durchführung des Verfahrens eine fluoreszierende Komponente eingesetzt wird. Im Rahmen von Untersuchungen welche sich mit dem Einfluß der Zelle auf die Chemikalie befassen, also Untersuchungen mit einem pharmakokinetischen Hintergrund, kann die Chemikalie als betroffene Komponente markiert mit einem radioaktiven Isotop angeboten werden. Die von
30 dem radioaktiven Isotop produzierte Strahlung kann durch einen entsprechenden Radioaktivitätsdetektor außerhalb des Reaktors erfaßt werden. Eine unterschiedliche radioaktive Markierung kann verwendet werden. Für die Auswahl der betreffenden Markierung in der Untersuchung kann aus dem vorhandenen Angebot ausgewählt werden. Die

Auswahl wird natürlich dadurch beeinflußt werden, welche Markierungen überhaupt für die beabsichtigte Untersuchung verfügbar oder verwendbar sind. Darüberhinaus gibt es jedoch weitere praktische Überlegungen. Kurzlebige radioaktive Verbindungen haben bei der Durchführung der Versuche gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren eindeutige Vorteile, weil es mit solchen Verbindungen mit wesentlich weniger Aufwand möglich ist, in relativ kurzen Abständen in dem gleichen Reaktor separate Versuche durchzuführen. Es stellt sich in bezug auf Reinigung, Entsorgung und Reststrahlung somit sehr vorteilhaft dar, solche kurzlebige Strahler zu verwenden. Als solche kurzlebige Strahler kommen z.B. ^{18}F und ^{18}O in Betracht. Demgegenüber stellen z.B. Untersuchungen mit ^{14}C eindeutige Nachteile dar.

10

Es wird aber für den Fachmann kein grundsätzlich neues Problem darstellen, zu überlegen, welche Radiotracer sich für seine Fragestellung am besten eignen. Die Anwendung von Radioaktivität in der biologischen Forschung ist ein Routineverfahren, das in vielen Versuchen Anwendung findet.

15

Es kann auch durchaus in Betracht kommen, in einer Untersuchungen zwei unterschiedliche markierte Verbindungen zu verwenden. Diese Möglichkeit kann nützlich sein, wenn in einer Untersuchung eine direkte Wirkung einer Chemikalie auf einem intrazellulären Vorgang sowie seine Pharmakokinetik erfaßt werden sollen. Bei einer solchen Untersuchung liegt somit eine markierte Chemikalie sowie möglicherweise eine markierte Vorstufe für den intrazellulären Vorgang vor.

20

Es ist ein weiteres Merkmal des erfindungsgemäßen Verfahrens, daß das Signal mit einem Detektionssystem außerhalb des Reaktors erfaßt wird. Es wird im Rahmen der Beschreibung der erfindungsgemäßen Vorrichtung näher auf die Ausführungsform des Detektionssystem eingegangen werden. Die Ausführung wird natürlich primär durch das produzierte Signal bestimmt sein. Bei Messungen an Komponenten mit einem radioaktiven Isotop wird das Detektionssystem ein System umfassen, daß zur Erfassung der radioaktiven Strahlung geeignet ist, während bei der Erfassung von Fluoreszenz eine Ausstattung zur Erfassung von Fluoreszenzstrahlen gewählt wird.

25

30

Es stellt ein weiteres bevorzugtes Merkmal der vorliegenden Erfindung dar, daß das im Reaktor von einer der betroffenen Komponenten produzierte Signal, welches außerhalb des

Reaktors von einem Detektionssystem erfaßt wird, sofort einem Rechner zugeleitet und weiter
verarbeitet wird. Eine solche bevorzugte Ausführungsform hat viele Vorteile. Es ist zunächst
erforderlich, eine entsprechende Software vorzubereiten, welche die Verarbeitung der Daten
ermöglicht. Ist diese Voraussetzung einmal erfüllt, kann das erfindungsgemäße Verfahren
5 vollautomatisch ablaufen, ohne daß manuelle Handlungen und entsprechende Bindung von
bedienendem Personal erforderlich sind. Insbesondere bei einer solchen Ausführungsform wird
der große Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens deutlich. Die regelmäßige Entnahme von
Proben bei dem Verfahren nach dem Stand der Technik, die Notwendigkeit, die entnommenen
Proben je nach Reaktionsablauf außerhalb des Reaktors weiter zu bearbeiten, und zum Schluß
10 die erzielten Daten weiterzuverarbeiten, führen zu einem aufwendigen und kostspieligen
Ablauf. Dieser Aufwand entfällt bei dem erfindungsgemäßen Verfahren. Wo der große
Aufwand bei dem Verfahren gemäß dem Stand der Technik möglicherweise dazu führte, dieses
bekannte Verfahren nur gelegentlich bei ganz bestimmten Untersuchungen anzuwenden, liegt
bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ohne weiteres die Möglichkeit vor, das Verfahren in
15 einem Routinescreening einzusetzen. Es ist z.B. ein großer Vorteil des erfindungsgemäßen
Verfahrens, daß bei Erfassung der Verweildauer der Chemikalie im Prüfsystem die
Notwendigkeit entfällt, eine solche Messung durch Beimischung eines Indikators
durchzuführen. Diese Beimischung eines Indikators wurde bei dem Verfahren gemäß dem
Stand der Technik beschrieben und war schon alleine deswegen unerwünscht, weil nie gänzlich
20 ausgeschlossen werden konnte, daß eine Wechselwirkung zwischen Chemikalie und Indikator
vorliegt. Außerdem konnte nur vermutet werden, daß das Verhalten beider Verbindungen im
Verfahren gleichermaßen abläuft. Insbesondere, wenn die Chemikalie von den Zellen
aufgenommen und metabolisiert wird, ist die Annahme, daß Indikator und Chemikalie sich
gleich verhalten, zweifelhaft.

25

Das Verfahren wird üblicherweise mit Zellen durchgeführt. Es ist jedoch ausdrücklich
daraufhinzuweisen, daß auch eine Anwendung ohne Zellen durchaus in Betracht kommt. Ein
einfaches Beispiel ist z.B. eine Untersuchung, welche zur Überprüfung der Spezifität
monoklonaler Antikörper durchgeführt werden kann. Dazu kann man die monoklonalen
30 Antikörper an festen Partikeln binden, wobei die vorstehend beschriebenen wiederum
bevorzugt verwendbar sind, um anschließend mit markierten Substraten Untersuchungen zur
Prüfung der Bindung dieser Substrate durchzuführen. Die Abreicherung des markierten

Substrats bzw. dessen Anreicherung im Bereich des Wirbel- oder Festbettes erlaubt die Spezifität der Bindung sowie die Bestimmung der Bindungskinetik.

Es lassen sich gleichermaßen Untersuchungen zur Beeinflussung des Antikörper-Substrat-Komplexes durch Testsubstanzen und Temperatur- oder pH-Veränderungen durchführen.

5

Auch weiter unten wird im Rahmen der Beschreibung einiger bevorzugten Verwendungen des erfindungsgemäßen Verfahrens ein weitere Möglichkeit einer Verwendung in einem zellfreien System beschrieben.

- 10 Die Erfindung betrifft ebenfalls eine Vorrichtung mit den Merkmalen des Anspruchs 6. Die Vorrichtung wurde mit dem Augenmerk erfunden, in dem erfindungsgemäßen Verfahren genutzt zu werden. Somit ist eine Vorrichtung vorgesehen, welche zur Messung der Interaktion von Chemikalien mit Zellen eingesetzt werden soll.

- 15 Die Vorrichtung weist einen Reaktor zur Aufnahme der Zellen auf, bzw. gemäß der bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens, zur Aufnahme der auf festen Partikeln immobilisierten Zellen.

Der Reaktor kann unterschiedlich ausgeführt sein und ist dem Verfahren angepaßt. Häufig
20 wird im erfindungsgemäßen Verfahren ein Wirbelbett vorgesehen sein und stellt der Reaktor dementsprechend einen Wirbelschichtreaktor dar. In einem Wirbelschichtreaktor wird üblicherweise flüssiges Medium einem die Zellen enthaltenden Reaktorteil mit einer solchen Flußgeschwindigkeit zugeführt, daß die Zellen sich nicht einerseits absetzen können, sondern ständig von dem Flüssigkeitsstrom aufgewirbelt werden, ohne jedoch mitgeführt zu werden.

25

Solche Wirbelschichtreaktoren werden beispielsweise in P 195 28 871.8 beschrieben. Ein solcher Wirbelschichtreaktor kann z.B. einen zylindrischen Reaktorrohr und ein konisch verjüngtes Ende aufweisen. Bei einem Reaktor mit einem Gesamtvolumen von beispielsweise 50 ml kann das Reaktorrohr einen Durchmesser von 10 - 20 mm aufweisen, das verjüngte
30 Ende demgegenüber einen Durchmesser, welcher dem eines vorgesehenen Umlaufsystems entspricht. Der Wirbelschichtreaktor kann im verjüngten unteren Ende ein Membran oder Filter aufweisen, um zu verhindern, daß Zellen entgegen dem Strom des flüssigen Mediums in das Umlaufsystem gelangen, absolut erforderlich ist dies jedoch nicht, da die Erfahrung mit

solchen Wirbelschichtreaktoren gezeigt hat, daß die Zellen bei richtiger Einstellung des Verfahrens den Bereich des zylindrischen Reaktorrohrs nicht verlassen.

Der Reaktor kann ebenfalls als Festbettreaktor ausgeführt sein. Der Reaktor kann auch dann
5 grundsätzlich ein Format aufweisen, wie es vorstehend in bezug auf einer Ausführung als
Wirbelschichtreaktor beschrieben wurde. Auch der Festbettreaktor kann somit einen
zylindrischen Reaktorrohr und ein verjüngtes Ende aufweisen. Bei einer Ausführung als
Festbettreaktor wird vorzugsweise das flüssige Medium von oben ab durch das Festbett
strömen, was selbstverständlich die Anordnung eines Filters, eines Membrans oder eines Siebes
10 in dem Reaktorrohr oder im Abschnitt des verjüngten Endes erforderlich macht.

Auch andere Typen von Reaktoren können in Betracht kommen. Jeder räumliche Anordnung,
welche zur Aufnahme von Zellen geeignet ist, kann als Reaktor in der erfindungsgemäßen
Vorrichtung in Betracht kommen.

15

Der Reaktor wird normalerweise aus Glas bestehen. Auch andere Materialien können in
Betracht kommen, aber es läßt sich nicht einfach ausdenken, welche Vorteile eine bestimmte
andere Ausführung für die erfindungsgemäße Vorrichtung haben würde, sollte sie in einem
anderen Material ausgeführt sein. Glas ist billig, beständig, gut reinigbar, durchsichtig und
20 durchlässig für die Signale welche gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren detektiert werden
müssen.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung muß des weiteren ein Umlaufsystem aufweisen. Es muß
vorgesehen sein, das flüssige Medium in der Vorrichtung zu rühren oder zu wirbeln ist, damit
25 eine effektive Homogenisierung des flüssigen Mediums im System vorgenommen werden kann.

Das Umlaufsystem kann jede beliebige Ausführung aufweisen, solange sie einen intensiven und
gründlichen Rührvorgang gewährleistet. Es ist eine bevorzugte Ausführungsform der
erfindungsgemäßen Vorrichtung, daß die Vorrichtung ein Umlaufsystem aufweist, welches am
30 unteren Ende des Reaktors eine erste Öffnung und am oberen Ende des Reaktors eine weitere
Öffnung umfaßt, wobei zwischen den beiden Öffnungen eine Leitung angeordnet ist. Durch
diese Anordnung wird das flüssige Medium ständig in eine Art Kreislaufbewegung

rundgepumpt, wobei für dieses Rundpumpen vorzugsweise eine Umwälzpumpe in der Leitung angeordnet wird.

Die Dimension der Öffnungen in dem Reaktor und das Format der Leitung ist kein
5 wesentliches Merkmal der erfindungsgemäßen Vorrichtung. Wenn der Reaktor gemäß der
vorstehend beschriebenen bevorzugten Ausführungsform ein Wirbelschichtreaktor ist, welcher
aus einem zylindrischen Reaktorrohr mit einem verjüngten unteren Ende besteht, wird die
Leitung an dem verjüngten unteren Ende angeschlossen. Der Durchmesser des verjüngten
Ende beträgt meistens unter 7,5 mm und bei einem solchen Durchmesser kann in einer relativ
10 einfachen Aufstellung einen Umlaufschlauch verwendet werden. Bei dieser bevorzugten
Ausführungsform wird im oberen Bereich des zylinderförmigen Reaktorrohrs die zweite
Öffnung angeordnet, welche bevorzugt den gleichen Durchmesser aufweist, damit für die
Leitung zwischen den beiden Öffnungen ein identischer Schlauch verwendet werden kann.

15 Die Vorrichtung muß Kontrollorgane zur Überwachung der Zusammensetzung des Mediums
aufweisen. Reproduzierbare und vergleichbare Untersuchungen setzen gleichbleibende
Bedingungen voraus. Konstanz der Zusammensetzung des flüssigen Mediums ist für eine
Arbeit mit Zellsystemen wichtig, weil nur so eine ausreichende Vitalität des Systems vorliegt.
Es können Parameter wie Konzentration der Inhaltsstoffe des Mediums, Konzentration der
20 Nährstoffe, pH, Osmolarität und Sauerstoffkonzentration mit entsprechenden Sensoren
überwacht werden. Die Kontrollorgane wie z.B. eine pH-Sonde, eine pO₂-Elektrode oder
Fließinjektionsanalytik zur Substrat- und Metabolitanalytik können in dem Reaktor sowie in
dem Umlaufsystem angeordnet sein. Idealerweise sind die Kontrollorgane in einem
automatisierten Kontrollsystem eingebaut, daß ebenfalls vorsieht, daß eine eventuell
25 erforderliche Anpassung der Zusammensetzung des flüssigen Mediums ebenfalls automatische
gesteuert wird. Eine solche Anpassung kann als Zufuhr irgendwelcher Inhaltsstoffen oder
Nährstoffe (gelöst oder ungelöst), als Zufuhr frisches Mediums oder eine Intensivierung der
Begasung vorgenommen werden.

30 Wie bereits im vorletzten Absatz angedeutet, weist die erfindungsgemäße Vorrichtung eine
Anordnung zur Begasung des Mediums auf. Mit einer solchen Begasung wird in den meisten
Untersuchungen eine Anordnung gemeint, welche speziell Sauerstoff zuführt. Für die meisten
biologischen System ist ein bestimmter minimaler Sauerstoffdruck für einen ordentlichen

Ablauf der intrazellulären Prozesse eine absolute Voraussetzung. Deswegen kommt auf eine gut funktionierende Anordnung zur Begasung besonders an.

Es kommt nicht auf eine bestimmte Ausführung der Anordnung zur Begasung an. In dem bereits mehrfach zitierten Stand der Technik gemäß P 195 37 033.3 ist eine Anordnung zur Begasung vorgesehen, welche eine Silikonmembran umfaßt, über welche Sauerstoff in das flüssige Medium gelangt. Die Vorrichtung gemäß dem Stand der Technik sah für diese Silikonmembran bevorzugt eine koaxiale Anordnung in dem Reaktorrohr vor. Eine solche koaxiale Anordnung hat in der erfindungsgemäßen Vorrichtung jedoch Nachteile, weil, wie nachfolgend mehr detailliert beschrieben wird, die Vorrichtung ein Detektionssystem umfaßt, und die Anordnung des Silikonmembrans in dem Reaktorrohr mit einer besonders bevorzugten Ausführungsform des Detektionssystems interferiert. Somit ist es günstiger, die Vorrichtung zur Begasung nicht in dem Reaktorrohr anzuordnen, sondern an irgendeiner Stelle in dem Umlaufsystem.

15

Die erfindungsgemäße Vorrichtung muß eine Stelle für die Zudosierung der Chemikalie aufweisen. Dabei kann vorgesehen sein, daß lediglich eine Stelle für die Zudosierung vorgesehen ist, es ist jedoch auch möglich, zwei unterschiedliche Positionen zur Dosierung vorzusehen, wobei eine der beiden Stellen für eine akute Injektion benutzt werden kann, die andere für eine Zudosierung welche als Infusion ausgeführt wird.

20

Es ist ein wesentliches Merkmal der vorliegenden Erfindung, daß die erfindungsgemäße Vorrichtung ein Detektionssystem zur Erfassung des bei der Interaktion von der Chemikalie mit der Zelle produzierten Signals aufweist. Bei der Beschreibung des erfindungsgemäßen Verfahrens wurde bereits dargestellt, daß das Verfahren mit unterschiedlichen Signalen gleichermaßen durchführbar ist oder sogar in einem einzelnen Versuchsdurchgang mit verschiedenen Signalen. Es ist offensichtlich, daß das Detektionssystem an dem jeweiligen Signal angepaßt werden muß. Es spielt jedoch bei der grundsätzlichen Beschreibung der erfindungsgemäßen Vorrichtung keine besondere Rolle, für die Erfassung welcher Signale das Detektionssystem vorgesehen ist.

25
30

Da die erfindungsgemäße Vorrichtung die Erfassung einer Interaktion einer Chemikalie mit Zellen bezweckt, wird die Anordnung des Detektionssystems im Bereich des Reaktors wo die Zellen sich befinden selbstverständlich das meist sinnvolle sein.

- 5 Bei einer Versuchsdurchführung mit einer Chemikalie, welche selbst das Signal produziert, wird es mit einer Positionierung des Detektionssystems im Bereich der Zellen möglich sein, zu erfassen, ob die Chemikalie sich im Bereich der Zellen anhäuft und wird ein zeitlicher Verlauf der Signalintensität deutlich werden. Wenn das Signal nicht von der Chemikalie selbst, sondern z.B. von einem Bestandteil der Zelle produziert wird, dessen Beeinflußung es zu
- 10 studieren gilt, gibt die Erfassung des Signals im Bereich der Zellen Aufschluß darüber, inwieweit die Chemikalie zeitlich eine vermehrte Aufnahme oder Ausschleusung diese Bestandteils bewerkstelligt.

- Obwohl eine Vorrichtung mit lediglich einem Detektionssystem somit bei verschiedenen
- 15 Fragestellungen einen Sinn macht, wird eine weitere mehr bevorzugte Ausführungsform mit zwei Detektionssystemen zu einem besseren Ergebnis führen. Bei dieser mehr bevorzugten Ausführungsform wird sich das erste Detektionssystem im Bereich der Zellen befinden, wie es bereits hiavor bei einer Vorrichtung mit nur einem Detektionssystem beschrieben wurde. Das zweite Detektionssystem jedoch soll an einer Stelle in der Vorrichtung positioniert werden, wo
- 20 keine Zellen vorliegen. Eine solche bevorzugte Ausführungsform erlaubt eine wesentlich aussagekräftigere Aussage darüber, ob ein bestimmtes Signalniveau im Bereich der Zellen wirklich durch eine Interaktion mit den Zellen zustande kommt oder vielmehr eine generelle Veränderung im gesamten System darstellt, welche letztlich lediglich durch ein Signal auf dem Niveau die Zellen enthaltenden flüssigen Mediums zustandekommt. Durch das zweite
- 25 Detektionssystem wird es mit einer wesentlicher größeren Genauigkeit und einer höheren Empfindlichkeit möglich sein, Interaktionen zwischen Chemikalien und Zellen zu erfassen. Die Detektion der Signalintensität im umlaufenden Medium und im Wirbelbett erlaubt die kontinuierliche Ermittlung der von den Zellen aufgenommene Chemikalienmenge.

- 30 Diese Beschreibung der erfindungsgemäßen Vorrichtung macht deutlich, weshalb eine Ausführungsform der Vorrichtung, welche eine koaxiale Position des Gasmembrans zur Oxygenierung des Mediums vorsieht, in Verbindung mit der Erfassung des Signals im Bereich des Reaktors einen Nachteil darstellt. Die Anordnung des Gasmembrans innerhalb des

Reaktors muß unvermeidlich zu Störungen im Meßvorgang führen. Nicht nur kann die Anwesenheit des Membrans stören, außerdem wird durch die Anordnung Medium verdrängt und dementsprechend eine Abschwächung des Signals verursacht.

- 5 Gemäß einer ersten Ausführungsform ist es vorgesehen, daß das Detektionssystem einen Detektor umfaßt. Gemäß einer weiteren mehr bevorzugten Ausführungsform soll das Detektionssystem zwei getrennte Detektoren umfassen, welche beispielsweise auf gegenüberliegende Seiten des Reaktors angeordnet sind (Koinzidenzmessung). Diese mehr bevorzugte Ausführungsform ist bei einem einzelnen Detektionssystem sowie bei einem
- 10 zweifachen Detektionssystem gleichermaßen zu bevorzugen.

- Gemäß weitere, noch mehr bevorzugte Ausführungsformen, sind noch weitere Detektionssysteme in der erfindungsgemäßen Vorrichtung vorgesehen. Eine erste weitere Anordnung ist im Bereich des Zugangs der Chemikalie vorgesehen, vorausgesetzt, das erfaßte
- 15 Signal wird von der Chemikalie selber produziert. Der Vorteil dieser Anordnung betrifft die Möglichkeit, eine gezielte und präzise Zudosierung der Chemikalie in das flüssige Medium vorzunehmen, weil mittels der direkten Erfassung des Signals im Zulaufbereich insgesamt die Erhöhung des Signals im System erfaßt wird.

- 20 Gemäß noch einer weiteren, ebenfalls bevorzugten Ausführungsform ist ein weiterer Detektor im Bereich des Umlaufsystems vorgesehen. Mit einem an dieser Position angeordneten Detektionssystem ist eine weitere Verfeinerung der Überwachung der Aktivität im System möglich.

- 25 Die Detektoren werden je über einen Hauptverstärker und einen Fensterdiskriminator (zur Einstellung auf das verwendete Radionuklid) mit einer Zählkarte in einem Rechner verbunden, welcher die Daten mit einem entsprechenden Programm anzeigt und/oder speichert.

- 30 Das Detektionssystem besteht gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform aus zwei oder mehr Meßköpfen (dies können je nach erfaßten Strahlung z.B. Gamma-Strahlungsdetektoren sein), einer zugehörigen Standard Ausselektronik und einem Datenerfassungssystem (Rechner).

Aufgrund der unterschiedlichen Strahlungsenergie welche im Wirbelschichtreaktor nachgewiesen werden sollen, muß ein hoher Dynamikbereich sichergestellt sein.

Für die Ausführung des Meßkopfes bieten sich verschiedene Möglichkeiten an, wie z.B. die Verwendung von Halbleiter-Detektoren oder Szintillations-Detektoren. Beide Typen von
5 Detektoren sind für Einzel- sowie Koinzidenzmessung geeignet und müssen sorgfältig mit einer Bleiummantelung abgeschirmt werden. Die ionisierende Strahlung kann direkt (Halbleiter) oder indirekt (Szintillation) nachgewiesen werden. Der Szintillator kann sowohl unmittelbar oder über Lichtwellenleiter an den Photomultiplier gekoppelt werden. Um die Empfindlichkeit der Meßanordnung zu erhöhen, können die Detektoren rund um den Reaktor angeordnet
10 werden.

Bei einer Durchführung des Verfahrens mit Radiotracern ist es zum Schutz des bedienenden Personals erforderlich, den Reaktor mit einem Bleischirm abzuschirmen. Die Kollimation der Detektoren auf das jeweilige Gesichtsfeld erfolgt durch Bleiabschirmungen geeigneter
15 Geometrie oder bei Positronenstrahlern optional durch Koinzidenzmessungen.

Das Ziel der Erfindung ist zwar grundsätzlich darauf abgestellt, daß die Untersuchung vollständig am geschlossenen System durchgeführt werden kann und eine Entnahme von Proben aus der Vorrichtung nicht erforderlich ist. Dieses Ziel läßt sich auch erreichen, wenn
20 das erfindungsgemäße Verfahren gemäß der vorstehenden Beschreibung durchgeführt wird. Es können jedoch Untersuchungen beabsichtigt sein, wo eine Entnahme erforderlich ist. Eine solche Entnahme ist z.B. dann erforderlich, wenn die Untersuchung Auskunft über die Identität der von den Zellen hergestellten Metaboliten, über eine Bindung an bestimmten Zellorganellen, über Beschädigungen der Zellen, und ähnliche Auskünfte die nur durch eine anschließende
25 Untersuchung außerhalb der Vorrichtung durchgeführt werden können. In solchen Fällen sieht das erfindungsgemäße Verfahren vor, daß zusätzlich zu den automatische erfaßten und on-line ausgewerteten Untersuchungen zu bestimmten Zeitpunkten Proben genommen werden, welche zur Auswertung außerhalb der Vorrichtung aufgearbeitet werden.

30 Sollte eine Abnahme von Proben aus der Vorrichtung erforderlich sein, ist in der Vorrichtung eine Entnahmestelle vorgesehen.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich grundsätzlich zur Anwendung in Untersuchungen welche zum Ziel haben, die pharmakokinetischen Eigenschaften von Chemikalien zu untersuchen. Das Verfahren ist ebenfalls geeignet, zur Durchführung von Untersuchungen zur Erfassung der toxischen Eigenschaften von Chemikalien.

5

Eine weitere Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens betrifft die Messung der Porosität in dem Reaktor.

Unter Porosität eines Wirbel- oder Festbettes versteht man den Anteil des flüssigen Mediums im Bereich des Bettes, welcher sich aus dem Zwischenkornvolumen und den zugänglichen

10 Hohlräumen im Innern der Träger zusammensetzt.

Im zellfreien Reaktor ist die Porosität somit der Quotient aus der im Bereich des Bettes gemessenen Signalintensität und der im trägerfreien Umlauf gemessenen Intensität.

Es ist eine Voraussetzung für eine solche Messung, daß die markierte Substanz nicht an den Trägern haftet, weil dies zu einer Anreicherung im Bereich des Bettes führen und somit zu
15 einem falschen Ergebnis führen würde.

Bei einem Wirbelbett führt die Erhöhung des Volumenstroms im Umlauf des Wirbelschichtreaktors zu einer Expansion des Wirbelbettes und damit zu einer Erhöhung der Porosität.

20 Die Porosität eines Wirbel- oder Festbettes kann mittels kontinuierlicher Datenerfassung ermittelt werden. Die Porosität ist vor allem für verfahrenstechnische Fragestellungen von Interesse.

Eine sehr konkrete Fragestellung kann sich ergeben, wenn im Rahmen einer Untersuchung mit
25 einem an festen Trägern immobilisierten Katalysator die Messung gewünscht wird, ob der immobilisierte Katalysator ausblutet (von den Trägern runtergespült wird). Bei dieser Fragestellung handelt es sich um eine Untersuchung welche in Abwesenheit von Zellen durchgeführt wird. Der Träger welche die Träger als Festbett oder als Wirbelbett enthält wird von einer flüssigen, das Substrat aufweisenden Phase durchströmt. Durch regelmäßige
30 Injektion einer ein Signal produzierende Verbindung, z.B. einem Radiotracer, kann die Porosität des Bettes gemessen werden. Bei einem Verlust des Katalysators wird eine Veränderung der Porosität festgestellt.

Beschreibung der Erfindung anhand von Abbildungen.

Figur 1 stellt schematisch eine Versuchsvorrichtung mit Wirbelschichtreaktor.

Figur 2 stellt schematische eine Versuchsvorrichtung mit Wirbelschichtreaktor dar.

- 5 Figur 3 stellt das Ergebnis einer Untersuchung mit ^{18}FDG in der erfindungsgemäßen Vorrichtung dar.

Figur 4 stellt das Ergebnis einer Untersuchung mit ^{18}FDG an humanen Gliomzellen dar.

Figur 5 stellt das Ergebnis einer Porositätsmessung dar.

- 10 In der Figur 1 ist schematisch eine erfindungsgemäße Vorrichtung dargestellt. Die Vorrichtung weist einen Reaktor 1 auf, welche aus einem zylindrischen Teil 2 und einem sich verjüngenden Ende 3 besteht. Der Reaktor 1 ist von einem Heizmantel 4 umgeben. Ein Umlaufsystem 6 ist dem Reaktor zugeordnet. Das in dem Reaktor vorhandene flüssige Medium wird mittels einer peristaltischen Umlaufpumpe 5 dem Reaktor entzogen und ihm über
- 15 dem Umlaufsystem 6 wieder zugeführt. Das Umlaufsystem 6 besteht in seiner einfachsten Ausführung aus einem Schlauch, welcher an Positionen 8 und 9 an dem Reaktor 1 angeschlossen ist. Bei der Position 7 kann dem Reaktor flüssiges Medium entnommen werden. Dem Umlaufsystem sind Kontrollorgane 10 zugeordnet welche eine laufende Überwachung der Zusammensetzung des Mediums ermöglichen. Die Kontrollorgane 10 umfassen immer eine
- 20 Sauerstoffsonde aber können ansonsten beliebige Meßgeräte umfassen. Es kann frisches flüssiges Medium zugeführt werden und zwar über die Leitung 11. Die Silikonmembran zur Begasung des flüssigen Mediums ist in einer Anordnung 12 im Umlaufsystem 6 integriert um eine eventuelle Störung der Meßvorgänge im Bereich des Reaktors 1 zu vermeiden. Zugabe von Chemikalien oder einen Signal produzierende Substanzen findet über einer Leitung 15
- 25 statt. Die in der Figur 1 gezeigte Anordnung umfaßt eine gemeinschaftliche Zufuhrleitung 15 welche für eine akute Injektion wie für eine Zugabe der Chemikalie oder der ein Signal produzierenden Substanz als Infusion verwendet werden kann. Wird eine akute Injektion vorgenommen, mit welchem Vorgang praktisch eine akute Injektion am Menschen oder am Tier initiiert werden soll, wird die Injektion mittels einer Spritze 16 durch eine Membran 17 in
- 30 den Teil 18 der Leitung vorgenommen. Ist eine Infusion vorgesehen, wird diese z.B. mittels einer Infusionspumpe 27 im Teil 19 der Leitung vorgenommen. Die Positionen der Zufuhrleitung 11, der Kontrollorgane 10, der Begasungsanordnung 12 und der Zufuhrleitung 15 sind alle dem Umlaufsystem zugeordnet, ihre genaue Position muß jedoch nicht unbedingt

sein wie es in der schematischen Figur dargestellt ist, es kommen für die gleiche Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens auch andere Positionen in Betracht, wobei auch die Reihenfolge der Anordnung in dem Umlaufsystem variiert werden kann. Die erfindungsgemäße Vorrichtung weist Detektoren zur Erfassung des bei der Interaktion der Zellen mit der Chemikalie produzierten Signals auf. Die Figur 1 stellt eine Vorrichtung dar, welche zwei Detektoren 20 und 21 umfaßt, wobei der Detektor 20 dem oberen Bereich des Reaktors 1, der Detektor 21 demgegenüber dem unteren Bereich des Reaktors 1 zugeordnet ist. Ein weiterer Detektor 22 ist dem Teil des Umlaufsystems zugeordnet, welcher sich direkt am verjüngten Ende des Reaktors anschließt. Noch ein weiterer Detektor 23 befindet sich an der Zufuhrleitung 15. Die Detektoren können für bestimmte Strahlenarten oder Fluoreszenzsignale optimiert sein, sie können aus einer Anregungslichtquelle und einer optischen Separierungseinheit zusätzlich zum Detektor bestehen oder auch als Kombination verschiedener Detektionssysteme ausgebildet sein. Der Reaktor 1 ist mit einem Deckel 24 abgeschlossen, welcher mit einem Schraubverschluß mit dem Reaktor verbunden wird. Der Deckel 24 weist Vorrichtungen zur Entnahme von Proben auf, welche hier nicht weiter dargestellt sind. Diese Entnahme kann steril mit einer Sterilbank vorgenommen werden.

Bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird der Reaktor 1 mit einem flüssigen Medium gefüllt, welches von der peristaltischen Umlaufpumpe 5 durch das Umlaufsystem 6 gepumpt wird. Bezieht sich die Untersuchung welche durchgeführt werden soll auf einer Reaktion in einem Wirbelbett wird das flüssige Medium durch die peristaltische Pumpe 5 in die Richtung des Pfeiles 25 gefördert. Es spricht von selber, daß bei einer Ausrichtung als Festbett eine Förderung in die entgegengesetzte Richtung vorgesehen wird. Der Reaktor weist in dem flüssigen Medium die festen Partikeln 26 auf, welche durch den konstanten Zustrom des flüssigen Mediums ständig aufgewirbelt werden, ohne jedoch den unteren Bereich des Reaktors 1 zu verlassen. Die on-line-Erfassung erfolgt durch den Detektor 22 als Kontrolle für die Einhaltung der Versuchsbedingungen, durch den Detektor 21 als Indikator für die von den Zellen aufgenommene Aktivität und durch den Detektor 20 als Detektor für die im Medium verbliebene Aktivität. Für die Kalibrierung des Systems d.h. für die quantitative Erfassung der in den Zellen aufgenommenen Aktivität wird erfindungsgemäß eine markierte Testflüssigkeit verwendet. Sie erlaubt durch den Vergleich der Meßdaten der Detektoren 20 und 21 die Bestimmung der markierten Substanzmenge welche sich an den Zellen angelagert hat oder von den Zellen aufgenommen und metabolisiert wird.

Die Figur 2 stellt eine weitere mögliche Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung dar. Im Unterschied zu der in der Figur 1 dargestellten Vorrichtung ist hier die Zufuhrleitung 15 an einer anderen Position im Umlaufsystem vorgesehen. Wesentlicher noch ist die Ausführung des Detektionssystems. Sämtliche Detektoren 20, 21, 22 und 23 sind bei dieser Ausführungsform nicht als einzelne Detektoren sondern als eine doppelte Ausfertigung vorgesehen. Eine solche Ausführung erlaubt eine wesentliche genauere Erfassung der Signalintensität.

10 Beschreibung der Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen.

Beispiel 1.

Untersuchungen zur Aufnahme von [18F]-markierter Fluorodeoxyglukose (18FDG) an humanen Gliomzellen (86HG39) im Wirbelschichtreaktor.

In einem Wirbelschichtreaktor wurden humane Hirntumorzellen (86HG39) auf offenporige Borosilikatglasträgern (Siran®, Schott, Mainz) immobilisiert und bis zu einer Zelldichte von ca $1 \cdot 10^8$ Zellen pro Gramm Träger kultiviert. Als Medium kam handelsübliches IMDM mit 10 %-igem Kälberserum zum Einsatz. Der Wirbelschichtreaktor war mit zwei Szintillationsdetektoren ausgestattet, einer auf der Höhe des Wirbelbettes (entsprechend Detektor 21 in der Figur 1) und einer oberhalb im Bereich des zellfreien Umlaufs (entsprechend Detektor 20 in der Figur 1).

25 Zu dem in der Figur 3 gekennzeichneten Zeitpunkt wurde der Wirbelschichtreaktor mit [18F]-markierter Fluorodeoxyglukose (^{18}F FDG) in Form einer Sprungfunktion beaufschlagt.

^{18}F FDG wird in der Klinik zur Untersuchung des Glukosestoffwechsels und zur Diagnose von Tumoren genutzt. Die Verbindung wird in die Zellen aufgenommen, aber im Gegensatz zur natürlichen Glukose nicht verstoffwechselt.

30 Die Signale im Wirbelbett und im zellfreien Umlauf sind in der Figur 3 dargestellt. Aus der Differenz zwischen dem Signal im Wirbelbett und im zellfreien Umlauf (dargestellt in Figur 4) ergibt sich direkt die intrazelluläre Anreicherung des Radiotracers in den immobilisierte Zellen.

Der radioaktive Zerfall und der Glasanteil im Wirbelbett wurden durch die Meßdatenerfassung bereits berücksichtigt.

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden dem Wirbelschichtreaktor Trägerproben mit immobilisierten Zellen entnommen (mittels eines im in der Figur 1 dargestellten Deckel 24 integrierten Trägerprobenahmesystem), um die intrazelluläre Akkumulation des Radiotracers off-line zu bestimmen und mit dem on-line erhaltenen Signal zu vergleichen.

Die Figur 4 zeigt das Ergebnis des Vergleiches der off-line und on-line Bestimmungen.

Es ist offensichtlich, daß der Verlauf der Kurve, welche die on-line erfaßte Bindung des Radiotracers an den Partikeln dokumentiert, perfekt mit dem Ergebnis der off-line Bestimmung übereinstimmt.

Beispiel 2.

15

In einem Wirbelschichtreaktor befand sich ein Wirbelbett bestehend aus offenporigen Borosilikatglaträgern (Siran®, Schott, Mainz) mit einem Durchmesser von 500 - 560 µm. Als Umlaufmedium wurde bei der Untersuchung entionisiertes Wasser verwendet.

Der Reaktor war mit zwei Szintillationsdetektoren ausgestattet, einer auf der Höhe des Wirbelbettes (entsprechend Detektor 21 in der Figur 1) und einer oberhalb im Bereich des zellfreien Umlaufs (entsprechend Detektor 20 in der Figur 1).

Zum Zeitpunkt $t=0$ wurde eine wäßrige [^{18}F]-markierte Fluoridlösung in das System injiziert (mittels einer Injektion in der Position 18 der Figur 1). Nach ca 5 Minuten hatte sich die Aktivität im Reaktor gleichmäßig durchmischt.

Der Quotient gebildet aus Aktivität im Wirbelbett und der Aktivität im Umlauf entspricht der aktuellen Porosität des Wirbelbettes, dieser Wert wird üblicherweise als Prozentwert dargestellt.

Anschließend wurden mittels der Umlaufpumpe (Umlaufpumpe 5 in der Figur 1) unterschiedliche Volumenströme für den Umlauf eingestellt. In Abhängigkeit vom Volumenstrom änderte sich die Expansion des Wirbelbettes und damit auch die Porosität, welche jeweils wie oben dargestellt durch Quotientenbildung der gemessenen Aktivitäten im Bereich des Wirbelbettes und des Umlaufs on-line gemessen wurde.

Die Figur 5 zeigt die so ermittelte Porosität als Funktion des Umlaufvolumenstroms.

Ansprüche.

- 5 1. Verfahren zur Durchführung der Messung einer Interaktion von einer Chemikalie mit in einem Reaktor enthaltenen Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß eine der bei der Interaktion zwischen der Chemikalie und den Zellen betroffenen Komponenten eine ein Signal produzierende Komponente darstellt, welches Signal sich zur Erfassung durch ein Detektionssystem außerhalb des Reaktors eignet.
- 10 2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Chemikalie in dem Reaktor mittels eines detektierbaren Signals erfaßt wird.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Chemikalie mittels
15 Erfassung der Radioaktivität detektierbar ist.
4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen an festen Partikeln immobilisiert sind.
- 20 5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das detektierbare Signal einem Rechner zugeleitet und on-line verarbeitet wird.
6. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Messung der Interaktion von Chemikalien mit Zellen in einem flüssigen Medium,
25 umfassend einen Reaktor zur Aufnahme der Zellen,
ein Umlaufsystem,
Kontrollorgane zur Überwachung der Zusammensetzung des Mediums,
eine Anordnung zur Begasung des Mediums und
mindestens einen Eingang für die Chemikalie,
30 dadurch gekennzeichnet, daß
in der Vorrichtung mindestens ein Detektionssystem zur Erfassung der Interaktion angeordnet ist.

7. Vorrichtung gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Umlaufsystem eine am unteren Ende des Reaktors angeordnete Öffnung umfaßt, welche mittels einer Leitung mit einer am oberen Ende des Reaktors angeordnete Öffnung verbunden ist.
- 5 8. Vorrichtung gemäß Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß in der Leitung eine Umwälzpumpe angeordnet ist.
9. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Reaktor ein Wirbelschichtreaktor ist.
- 10 10. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Anordnung zur Begasung des Mediums eine Begasungsmembran zur blasenfreie Begasung umfaßt.
- 15 11. Vorrichtung gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Anordnung in der Leitung gemäß Anspruch 7 angeordnet ist.
12. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 6 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß eine Anordnung zur Entnahme von Proben angeordnet ist.
- 20 13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 6 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung ein Detektionssystem im Bereich der Zellen und ein weiteres Detektionssystem im Bereich des zellfreien Überstands umfaßt.
- 25 14. Vorrichtung gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß ein weiteres Detektionssystem der Leitung gemäß Anspruch 7 zugeordnet ist.
15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß ein weiteres Detektionssystem dem Eingang für die Chemikalie zugeordnet ist.
- 30 16. Verwendung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Messung von pharmakinetischen Eigenschaften von Chemikalien.

17. Verwendung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Erfassung von pharmakologischen oder toxischen Eigenschaften von Chemikalien.

5 18. Verwendung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Messung der Porosität in einem Wirbelbett oder einem Festbett.

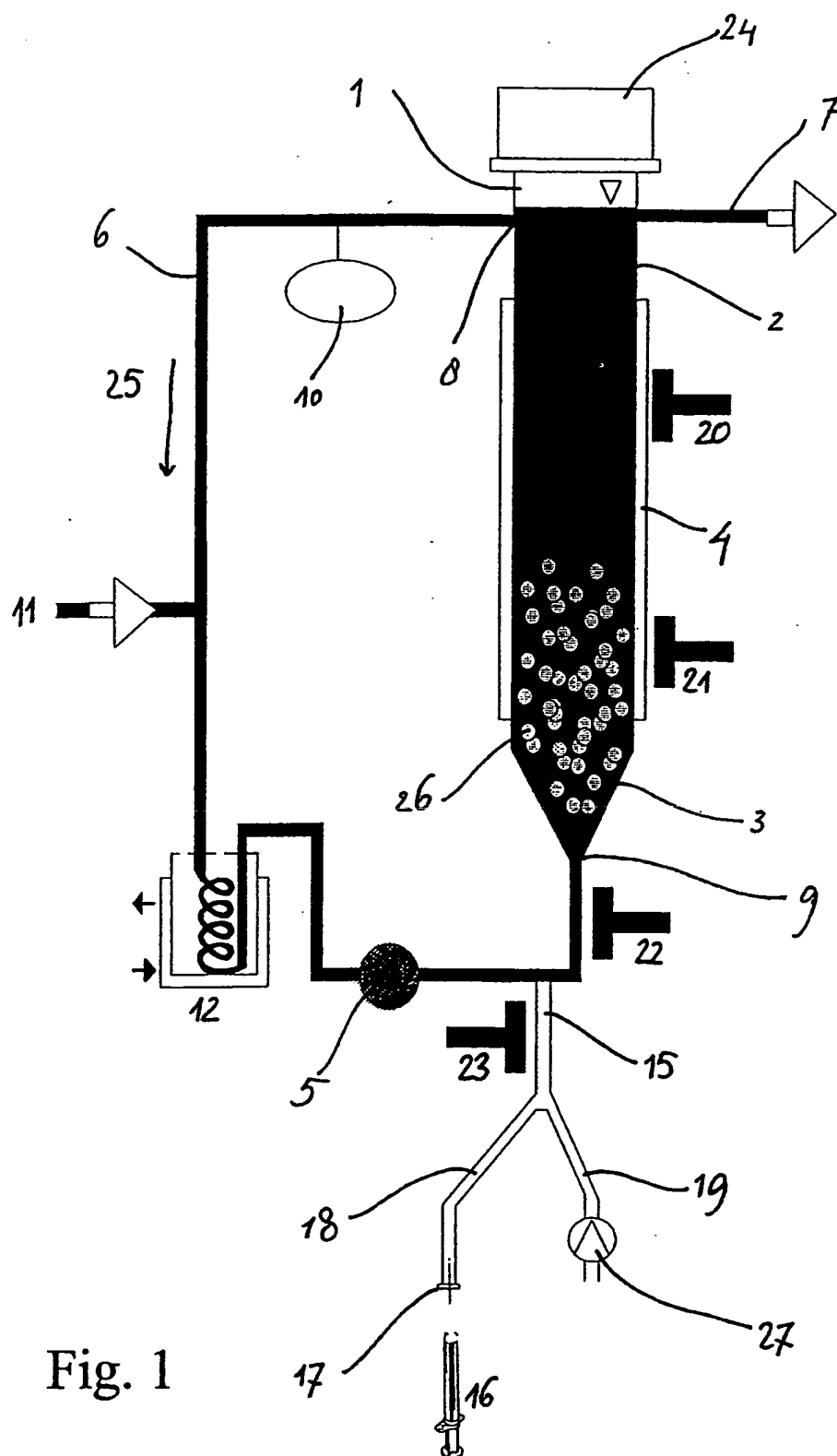


Fig. 1

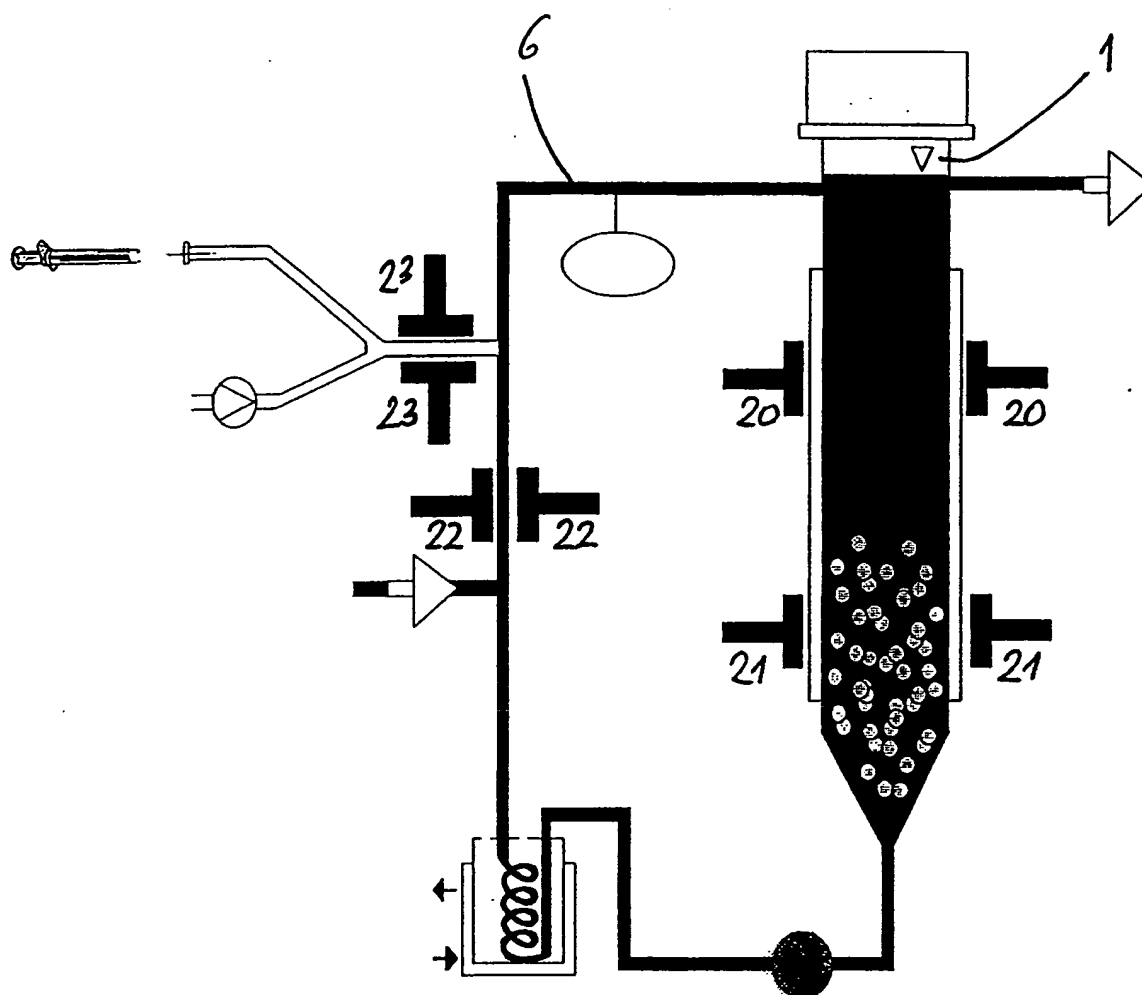


Fig. 2

Anwendungsbeispiel

Aufnahme von ^{18}F FDG an humanen Gliomzellen

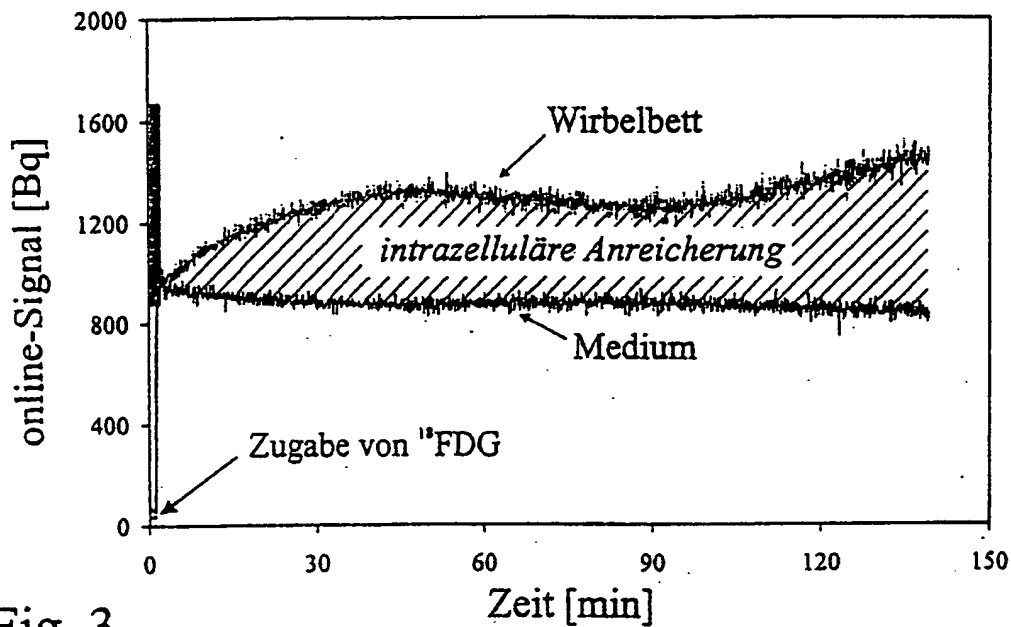


Fig. 3

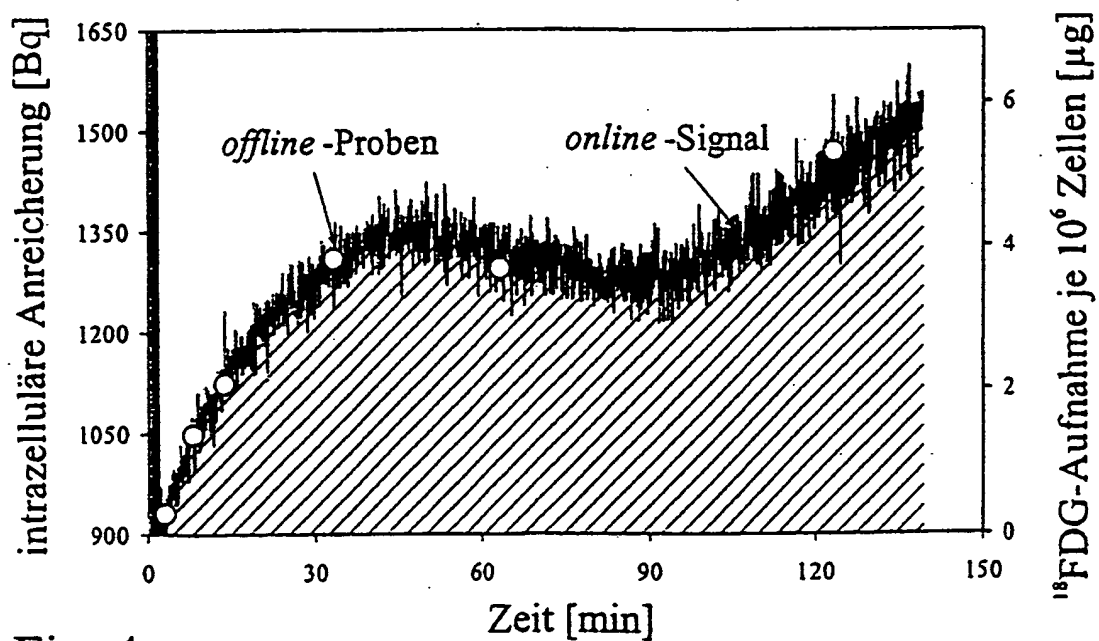


Fig. 4

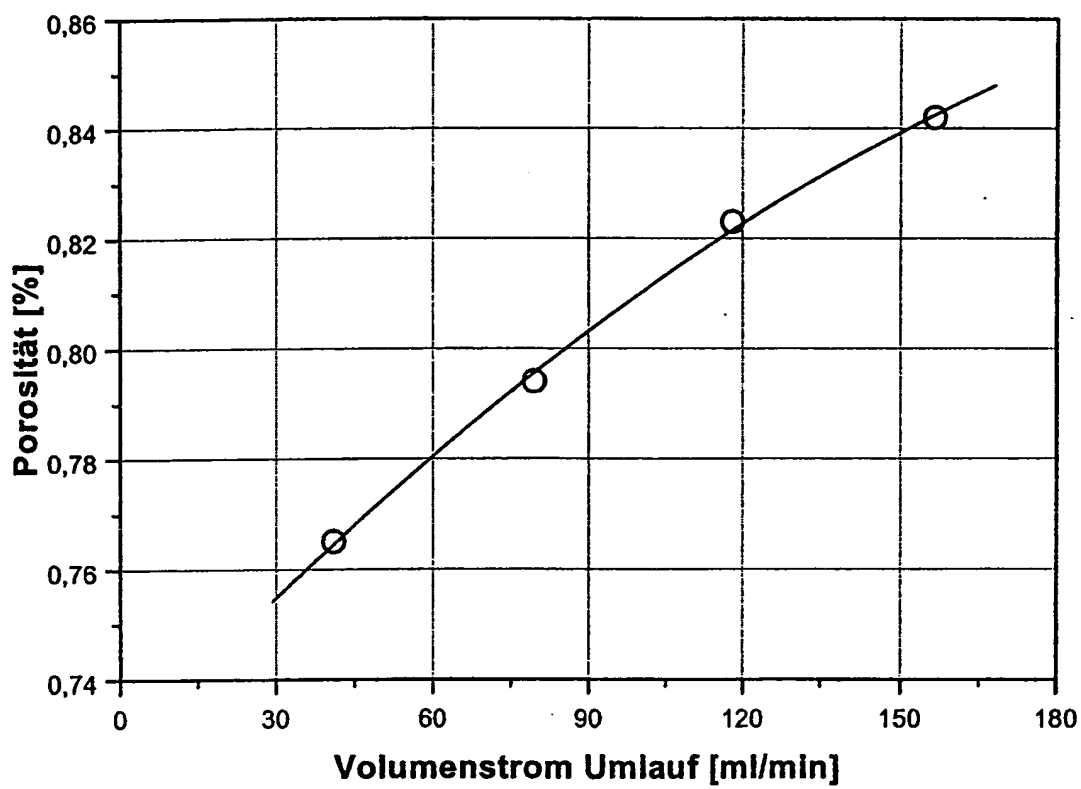


Fig. 5

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.